

# FUNCION INMUNOSUPRESORA DE LAS GLICOPROTEINAS DE VIH-1, AGENTE CAUSAL DEL SIDA

## PALABRAS CLAVES: SIDA, VIH, GP 120, GP41, INMUNOSUPRESION

José A. Bonilla Vargas\*, Johannes Lower\*\* y Reinhard Kurth\*\*.

### RESUMEN

*En este trabajo se demuestra que el virus VIH-1 inactivado por la luz ultravioleta inhibe la proliferación de linfocitos humanos estimulados con mitógenos; estos datos concuerdan con reportes de otros grupos. Además se observó que no es necesaria la presencia del virus completo ya que membranas celulares aisladas de células infectadas también tienen efecto supresor. Existen indicios de que la glicoproteína de transmembrana (gp41) de VIH-1 induce un efecto supresor, pero los experimentos aquí descritos usando gp41 purificada no pudieron confirmar esas observaciones.*

*El efecto supresor de VIH-1 pudo ser bloqueado con anticuerpos monoclonales anti-CD4 (epitopio OKT4a) lo que implica que la interacción entre el receptor de los linfocitos T con la glicoproteína de superficie (gp120) juega un papel importante. Esto sugiere y confirma resultados de otros grupos que la gp120 tiene, efecto inmunosupresor.*

*Los sueros de pacientes positivos no mostraron efecto neutralizante sobre el virus aun cuando el suero contiene anticuerpos contra todas las proteínas estructurales del virus. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1990; 11(2): -).*

### INTRODUCCION

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) está dirigida principalmente a las células que posean el receptor CD4 en su superficie. Se ha demostrado que la glicoproteína de superficie gp120 de VIH-1 interacciona específicamente con este receptor celular (8, 15, 21). El CD4 se encuentra en la superficie de los linfocitos T, pero también está presente en macrófagos y células del mismo origen. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el CD4 bloquean la infección *in vitro* por VIH-1, así como la inducción del efecto citopático (29).

Nuestros resultados confirman el efecto supresor de VIH-1 sobre la proliferación de linfocitos humanos (23, 27, 33).

Actualmente no existe evidencia concluyente en cuanto al papel de las glicoproteínas en los mecanismos de infección e inmunosupresión, ni si la patología observada en los pacientes con SIDA es un efecto directo de la inmunosupresión o si otros factores desconocidos coactúan también.

Algunos investigadores han postulado que tres péptidos sintéticos derivados de la gp41 de VIH-1 tienen capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos humanos (4, 28). Otros reportan efectos similares mediados por la proteína gag p18 (11) y por la proteína reguladora tat (32). También se ha reportado que la gp120 de VIH-1 induce un efecto similar (5, 10, 22, 26, 30).

Para tratar de esclarecer esta contradicción, se desarrolló un método para purifi-

\* Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) Universidad de Costa Rica, COSTA RICA.

\*\* Paul Ehrlich Institut, 6070 Langen, Rep. Fed. Alemania.

car gp41 de VIH-1. Desafortunadamente, la proteína se obtuvo en soluciones con detergentes, lo que impidió su uso directo en pruebas de inmunosupresión. En forma alterna, la gp41 se acopló a platos plásticos de cultivo en donde se puso a prueba con linfocitos humanos. También se investigó la actividad de la gp120. Se usaron anticuerpos monoclonales anti-CD4 para bloquear la interacción gp120-CD4. Este trabajo se diseñó para reexaminar el efecto inmunosupresor de VIH-1 y para analizar más detalladamente el papel de las glicoproteínas virales en la inhibición *in vitro* de los linfocitos humanos.

## MATERIALES Y METODOS

*Células.* Las líneas celulares H9 y MOLT 3 se cultivaron en RPMI 1640 (GIBCO) con nistatina 100 ug/ml, estreptomycin 50 mg/ml y penicilina 100 U/ml. (SERVA). L-Glutamina 2mM (Seromed) y suero fetal bovino al 5% (Boehringer).

*Virus.* Las células descritas anteriormente fueron infectadas con VIH-1 (HTLV-III<sub>B</sub>) y cultivadas en la misma forma.

*Purificación del virus.* El sobrenadante de las células infectadas se aclaró y luego se centrifugó a 19.000 rpm en un rotor Ti19 (Beckman) por 2 horas. El botón se resuspendió en tampón de Tris 0.01 M. pH 7.2 con 0.25 M de sacarosa y 5 mM de, MgCl<sub>2</sub> (TSaM), se colocó sobre un colchón doble de sacarosa de 25 y 40% en un tampón de Tris 0.01 M pH 7.2 con 1 mM EDTA (TE) y se centrifugó a 28.000 rpm en un rotor SW28 (Beckman) por una hora. Se separó la banda viral (opaca) sobre la sacarosa al 40% se diluyó 4X en TE y se centrifugó de nuevo a 28.000 rpm. El botón viral se resuspendió en TSaM y se congeló en N<sub>2</sub> líquido.

*Electroforesis SDS-PAGE.* El método descrito por Laemmli (17) en geles al 10% de acrilamida fue usado en todas las electroforesis.

*Western Blot.* Luego de la electroforesis los geles fueron transferidos a papel de nitrocelulosa en tampón de Tris 0,025 M y

Glicina 0,192 M pH 8,3 con 20% de metanol. Se bloqueó el papel en tampón PBS con 1% de Albúmina Sérica Bovina (ASB) y 0,1% Tween 20. El primer anticuerpo y la proteína A-peroxidasa se diluyeron en la misma solución. Como sustrato se usó Diaminobencidina.

*Linfocitos humanos.* Se aislaron de donadores seronegativos para VIH-1 según el método descrito por Boyum (2) en gradientes de Ficoll (Sigma).

*Pruebas de estimulación de linfocitos.* Las células se suspendieron en RPMI, se plataron (10<sup>5</sup> células/pocillo) en platos de microtitulo (NUNC) y se estimularon con mitógeno (PHA) a una concentración final de 10 µg/ml. Luego de 48 horas de incubación se agregó µCi/pocillo de <sup>3</sup>H-timidina (Amersham) y se incubó por 16 horas más. Al final las células se lisaron sobre filtros de papel de vidrio y se determinó la cantidad de radioactividad incorporada. Se corrieron controles sin PHA y se restó del total de radioactividad.

*Estimulación de linfocitos en presencia de virus.* Los linfocitos fueron preincubados 2-4 horas con diferentes concentraciones de UV-VIH (2-20 µg/pocillo) antes de la estimulación con PHA, el experimento se continuó como se describió anteriormente. Como control, se usaron preparaciones de células sin infectar.

*Efecto de sueros VIH-1 positivos sobre la inhibición de linfocitos.* 10 µg de UV-VIH-1 se incubaron por 2 horas con 5, 10 y 20 µl de suero de diferentes pacientes, luego esta mezcla se incubó con linfocitos y los experimentos se continuaron como se describió anteriormente. De la misma forma se probó el anticuerpo monoclonal anti-gp41 que se usó posteriormente para la purificación de gp41.

*Membranas de células infectadas con VIH1.* Se aislaron membranas de la línea celular H9 infectada con VIH-1 como lo describe Demus (9). Se determinó el efecto supresor de estas preparaciones en concentraciones de 2-20 µg de proteína/pocillo. Se usaron preparaciones de células sin infectar como controles.

*Purificación de gp41 de VIH-1.* El virus purificado fue tratado con tampón de lisis (0,05 M  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$  pH4, 0,1M NaCl, 2% Triton X100) por 30 min y centrifugado a 100.000 x g por una hora. El sobrenadante se pasó por una columna Lentil-Lectin Sepharosa 4B (Pharmacia) equilibrada en tampón de lisis. Las glicoproteínas retenidas en la columna se eluyeron con 0,5 M Manopiranosido y se analizaron por Western blot. Las fracciones con glicoproteínas virales se pasaron por una columna de afinidad preparada con anticuerpos monoclonales anti-gp41 (Sephacrose® CNBr). La gp41 se eluyó con 4 M  $\text{MgCl}_2$ .

*ELISA.* 100  $\mu$  l/pocillo de gp41 en tampón de lisis (diluciones 1/2) se incubaron en platos de microtítulo por 16 horas. Como control se utilizaron 20  $\mu$  g de VIH-1 incubados de la misma manera. El método de ELISA que se utilizó fue descrito por Kurth *et al* (16). Una "ud. de gp41" se definió como la cantidad de gp41 que corresponde a 1  $\mu$  g de VIH-1 determinado en ELISA con anticuerpos anti-gp41.

*Estimulación de linfocitos en presencia de gp41.* Se incubaron diluciones de gp41 (0.06-20  $\mu$  g/pocillo) por 16 horas. Los pocillos se lavaron con PBS estéril para eliminar sales, detergente y proteína no adsorbida, para luego platear los linfocitos. El experimento de estimulación se continuó como ya se ha descrito. Como controles se utilizaron albúmina sérica bovina y VIH-1.

*Bloqueo del efecto supresor con anticuerpos anti-CD4.* Anticuerpos monoclonales anti-CD4 (epitopios OKT4 a-f) se preincubaron con linfocitos por 2 horas a 37 °C antes de añadir el virus y el mitógeno. Se usaron anti-CD8 y anti-IgG humana como controles.

## RESULTADOS

*VIH- 1 inhibe la linfoproliferación.* La estimulación de linfocitos humanos por medio de PHA es fuertemente inhibida cuando se hace en presencia de UV-VIH-1 (Fig. 1) Se observó también una variación en los gra-

dos de supresión entre los linfocitos de diferentes donadores, algunos de ellos fueron solo débilmente inhibidos por el virus. Este efecto no se debe a la proporción de linfocitos T en cada muestra ya que la mayoría de los donadores presentaron valores muy parecidos en la razón T/B. 10  $\mu$ g de virus por pocillo ( $10^5$  células) dan valores cercanos al 50% de inhibición. Estas condiciones se usaron en el resto de los experimentos.

*Efecto de las membranas de células infectadas con VIH-1.* Las membranas celulares contienen proteínas virales, principalmente glicoproteínas y p24 (datos no mostrados). Estas preparaciones tienen efecto inhibitorio similar al de UV-VIH-1 (Fig. 2). Las membranas de células sin infectar no mostraron efecto alguno. *Efecto de sueros seropositivos por VIH-1.* Los sueros de diferentes pacientes no neutralizaron del efecto supresor de VIH-1. Los sueros tienen anticuerpos contra las principales proteínas virales.

*Purificación de la gp41.* Las glicoproteínas virales fueron solubilizadas con el tampón de lisis. Luego de la cromatografía de afinidad con lectina, se detectaron gp120 y gp41 en el eluido. Esta fracción se pasó por una columna de afinidad (anti-gp41) y el eluido se probó en ELISA con monoclonales anti-gp41 y suero anti-VIH-1 para cuantificar en comparación con 1  $\mu$ g de virus completo. La cantidad de gp41 aislada fue muy poca, 20 unidades de gp41 se detectaron en Western blot como una sola banda (Fig. 3); sin embargo al sobrecargar un gel con 10 veces más muestra, se observaron varios contaminantes, principalmente cadenas livianas y pesadas de los anticuerpos que se desprenden de la columna. No se detectaron otras proteínas de origen viral.

*Estimulación de linfocitos en presencia de gp41.* La proteína se absorbió a platos de microtítulo. Los ELISA realizados luego de los lavados mostraron que la gp41 se encontraba fuertemente adherida al plástico. No se detectó actividad inhibitoria (Fig. 4), aún cuando se elevó su concentración en 400%.

*Bloqueo de la actividad inhibitoria con anticuerpos anti-CD4.* De los anticuerpos monoclonales usados en estos experimentos, solo el anti-OKT4a redujo significativamente el efecto supresor del virus (Fig. 5). Esto no es un efecto directo del anticuerpo sobre el virus ya que VIH-1 tratado con los diferentes anticuerpos aun es capaz de suprimir la linfoproliferación.

## DISCUSION

La proliferación de linfocitos estimulados con mitógeno se redujo en aproximadamente un 50% cuando se usaron 10 µg de VIH-1/pocillo (Fig. 1). Estos resultados están de acuerdo con reportes de otros grupos que trabajaron con modelos animales (7, 33) y con VIH-1 en humanos (1, 23, 27).

Las variaciones observadas entre diferentes donadores se podrían deber a la constitución genética de cada individuo. Es tentador postular que los donantes de células más resistentes serían portadores sanos y/o tendrían un período de latencia más largo en caso de una infección con el virus, y lo contrario para los donantes de células más sensibles.

El efecto supresor es un evento bastante rápido e irreversible. Al lavar las células a los 5 minutos de la interacción con el virus, no se reestablece la capacidad de estimulación. Esto sugiere un acoplamiento fuerte y/o un internamiento rápido de la(s) proteína(s) responsables. Además, el hecho de que las membranas obtenidas de células infectadas tengan un efecto similar (Fig. 2) demuestra que para la inducción de tal efecto no se necesita el virus completo o infectivo.

La incapacidad de los sueros de pacientes seropositivos para neutralizar el virus sugiere que la región responsable de este efecto es muy poco antigénica o está escondida en la estructura tridimensional de la proteína, haciéndola inaccesible al sistema inmune.

Chanh *et al.* (4) reportaron que dos péptidos sintéticos de la gp41 (seq. 735-752 y

846-860) tienen un efecto supresor sobre linfocitos humanos. También se describió un efecto supresor sobre las células NK y sobre la actividad LAK; ambas se ven disminuidas en los pacientes con SIDA (3). Ruegg *et al.* (28) describen algo parecido para el péptido sintético (seq. 581-597). Este péptido tiene un 47% de homología con p15E, al que se le ha descrito actividad supresora. Este péptido es parte de la proteína de membrana de FeLV y otros retrovirus (6).

Frédérique *et al.* (11) reportaron que la p18 de VIH-1 (gag) inhibe la proliferación celular en el cultivo mixto de linfocitos (MLR) de humanos y murinos. Asimismo, Viscidi *et al.* (32) describieron que la proteína tat de VIH-1, así como un péptido sintético de ella (aminocidos 1-58) inhiben la proliferación antigénica pero no la mitogénica de los linfocitos humanos.

Sería fácil postular que el severo estado de inmunosupresión que presentan los pacientes con SIDA se pueda deber a la combinación de varios mecanismos; sin embargo, los virus no desarrollan varios mecanismos para lograr una misma actividad biológica.

Para analizar detalladamente estas contradicciones, se desarrolló un método para purificar gp41 VIH-1; debido a que esta proteína es fuertemente hidrofóbica, se tuvo que utilizar Triton X100 durante todo el proceso, de otra manera, la proteína precipita y no se recupera. Por la poca cantidad de proteína que se obtuvo, y para tener una cuantificación comparable al virus completo, no se hizo la determinación de proteínas convencional, sino que se calculó su concentración en relación con el VIH-1 en un ELISA.

En los experimentos de inhibición, la gp41 purificada no indujo actividad supresora (Fig. 4). El anticuerpo monoclonal antigp41 que se usó para aislar la proteína no tuvo efecto neutralizante sobre VIH-1. Este anticuerpo reacciona específica y fuertemente con la gp41; reconoce los aminoácidos 601-613 que están en la parte externa de la gp41. Este péptido traslapa con un sitio altamente inmunogénico (598-609)

(12, 14, 25), que es reconocido por casi el 100% de las personas seropositivas. Dos interpretaciones para estos resultados son: 1) el efecto supresor de los péptidos sin glicosilar (existen 4 sitios de N-glicosilación en la parte externa de la gp41 (24)) se debe a algún factor experimental desconocido y la gp41 no tiene efecto supresor o ii) la actividad inhibitoria se pierde durante el proceso experimental y la gp41 no se presenta en forma apropiada a los linfocitos. El receptor CD4 de los linfocitos T reacciona específicamente con la gp120 de VIH-1 (8, 15, 21). Los anticuerpos monoclonales anti-CD4 (anti-OKT4a y OKT4f) bloquean la infección "in vitro" de las células CD4 positivas e inhiben la formación de sincicios mediado por gp120 de VIH-1 (29). Al incubar linfocitos con anti-OKT4a antes de añadir el virus se reestablece la capacidad proliferativa de las células (Fig. 5). Los anticuerpos contra otros epitopios no tuvieron efecto. Además, Mann et al. (22) y Chirmule *et al.* (5) reportaron que la gp120 es responsable de la supresión *in vitro*. Estos datos sugieren que la interacción gp120-CD4 juega un papel muy importante en el evento de supresión; sin embargo, no se puede descartar un efecto cooperador de otras proteínas virales y/o receptores celulares. Lo que si es claro es que la interacción gp120-CD4 (OKT4a) es fuerte, rápida e independiente de la infectividad. Estas últimas observaciones podrían explicar la inmunosupresión observada en los pacientes con SIDA en quienes la presencia de gp120 circulante (libre o unida a anticuerpos), las células con antígenos de VIH (20, 31), o los linfocitos infectados con VIH-1 con antígenos en su superficie (18, 19) podrían jugar un papel importante en la inhibición directa de otros linfocitos durante las interacciones celulares normales de la respuesta inmune. Alternativamente, las células con gp120 en su superficie podrían ser destruidas por mecanismos de citotoxicidad. Estos eventos ocurrirían aun en ausencia de viremia o de infección aguda, y explican la severa inmunodeficiencia observada en los pacientes

con SIDA, en quienes se ha demostrado la presencia de muy pocos virus integrados en los linfocitos (13).

Varios investigadores han demostrado la capacidad supresora de la gp120 de VIH-1 (5, 22, 28, 30). También se encontró que la gp120 inhibe específicamente las funciones de las células T4+, probablemente por bloqueo de la interacción CD4-MHC (10) y/o por inhibición del ARNm de la interleucina 2 (26).

Los experimentos aquí descritos demuestran en forma indirecta el mismo efecto: los anticuerpos anti-OKT4a bloquean el efecto supresor del virus, señalando claramente a la glicoproteína de superficie como responsable del efecto supresor.

Los resultados con gp41 no son concluyentes. Esta glicoproteína desnaturalizada no indujo algún efecto. No se han hecho experimentos con proteína nativa debido a su fuerte carácter hidrofóbico que dificulta su purificación. Entre las alternativas para investigar las funciones de la gp41 están la inclusión de esta proteína en micelas para presentarla en forma más natural o aislar péptidos hidrofílicos que pudieran ser probados en experimentos de linfoproliferación.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es parte de mi tesis de doctorado que se llevó a cabo en la Facultad de Bioquímica de la Universidad J. W. Goethe de Frankfurt, Alemania.

Durante mis años de estudio fui becario del Servicio de Intercambio Académico Alemán (DAAD) y de la Universidad de Costa Rica.

Agradezco la colaboración de mis profesores, colegas y amigos del Instituto Paul Ehrlich, lugar donde se realizaron todas las investigaciones.

## ABSTRACT

*We demonstrated that UV-inactivated HIV1 inhibits the proliferation of mitogen stimulated lymphocytes supporting similar*

results by other groups. Infective or complete virus is not necessary to induce suppression. Cell membranes isolated from infected cells showed inhibitory activity as well.

There are indications that the transmembrane glycoprotein gp41 of HIV1 has an immunosuppressive effect on stimulated human lymphocytes. Our experiments using purified gp41 could not support these observations.

The suppressive effect of HIV-1 could be blocked by Mabs anti-CD4 (epitope OKT4a) implicating an active role of the T cell receptor-gp120 interaction. This suggests and confirms observations from other groups that gp120 has an immunosuppressive effect.

Sera from HIV-1 positive patients could not neutralize the inhibitory activity of the virus although the sera contained antibodies against all viral proteins.

## BIBLIOGRAFIA

1. Amadori, A., Faulkner-Valle, CP., De rossi, A., Zanovello, P., Collavo, D. and Chieco-Bianchi, L. HIV-mediated Immunosuppression: *in vitro* inhibition of T-lymphocyte proliferation response by UV-inactivated virus. *Clin. Immunol. Immunopathol* 1988; 46: 37-54.
2. Boyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968; 21 (Suppl. B9): 1-114.
3. Cauda, R., Tumbarello, M., Ortona, L., Kanda, P., Chanh, T.C. and Kennedy, R.C. HIV gp41 synthetic peptides inhibit LAK activity. Abstract M.C.O.32. V International Conference on AIDS. Montreal, Canada. 1989.
4. Chanh, T.C., Kennedy, R.C. & Kanda, P. Synthetic peptides homologous to HIV transmembrane glycoprotein suppress normal human lymphocyte blastogenic response. *Cell Immunol.* 1988; 111:77-86.
5. Chirmule, N., Kalyanaraman, V., Oyaizu, M. and Pahwa, S. Inhibitory influences of envelope glycoproteins of HIV-1 on normal immune responses. *J. Adq. Immun. Def. Sym.* 1988; 1: 425-430.
6. Cianciolo, G.J., Copeland, T.D., Orozlan, S. & Snyderman, R. Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science* 1985; 230: 453-455.
7. Copeland, E.A., Rinehart, J.J., Lewis, M., Mathes, L., Olsen R. & Sagone, A. The mechanism of retrovirus suppression of human T cell proliferation *in vitro*. *J. Immunol* 1983; 131: 2017-2020.
8. Dalgleish, A.G., Beverley, P.C.L. Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F. & Weiss, RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984; 312: 763-766.
9. Demus, H. Subcellular fractionation of human lymphocytes. *Bioch Bioph. Acta* 1973; 291: 93-106.
10. Diamond, D.C., Sleckman, B.P., Gregory, T., Lasky, LA., Greenstein, J.L. and Burakoff, S. Inhibition of CD4+ cell function by the envelope glycoprotein, gp120. *J. Immunol* 1988; 141: 3715-3717.
11. Frédérique, M. Cheynier, R, Lecaud, G., Rautmann, G., Guy, B., Kieny, M.P., Girard, M. and Plata, F. HIV recombinant p18 core protein inhibits proliferative responses by normal lymphocytes in human and mice. Abstract T.C.P. 77. V International Conference on AIDS. 1989; Montreal, Canada.
12. Gnann, J.W., Nelson, J.A. & Oldstone, M.B.A. Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 1987; 61: 2639-2641.
13. Harper, M.E., Marselle, L.M., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. Detection of lymphocytes expressing human lymphotropic virus III in lymph nodes and peripheral blood from

- infected individuals by in situ hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 772-775.
14. Klasse, P.J., Pipkom, R. & Blomberg, J. Presence of antibodies to a putatively immunosuppressive part of human immunodeficiency virus (HIV) envelope glycoprotein GP41 is strongly associated with health among HIVpositive subjects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 5225-5229.
  15. Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J. Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.C. & Montagner, L. T-lymphocyte T-4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984; 312 767-768.
  16. Kurth, R., Mikschy, U., Tondera, C., Lizonova, A., Brede, H.D., Helm, E.B. Bergmann, L., Frank, H., Popovic, M. and Gallo, R.C. HTLV-III Infektionen bei Patienten mit AIDS und Lymphadenopathie-Syndrom. *Münch. med. Wschr.* 1984; 46: 1363-1368.
  17. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-684.
  18. Lanzavecchia, A., Roosnek, E., Gregory, T. Berman, P. and Abrignani, S. T cells can present antigens such as HIV gp120 targeted to their own surface molecules. *Nature* 1988; 334: 530-532.
  19. Lyster, H.K., Matthews, T.J. Langlois, A.J., Bolognesi, D.P. & Weinhold, K.J. Human T-cell lymphotropic virus III glycoprotein (gp120) bound to CD4 determinate on normal lymphocytes and expressed by infected cells serves as target for immune attack. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 4601-4605.
  20. Macatonia, S.E., Patterson, S. and Knight, S.C. Suppression of immune responses by dendritic cells infected with HIV. *Immunology* 1989; 67: 285-289.
  21. Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A. & Axel, R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and in the brain. *Cell* 1986; 47: 333-348.
  22. Mann, D.L., Lasane, F., Popovic, M., Arthur, L.O., Robey, W.G., Blattner, W.A. & Newman, J.F. HTLV III large envelope protein (gp 120) suppresses PHA-induced lymphocyte blastogenesis. *J. Immunol.* 1987; 138: 2640-2644.
  23. Margolick, J.B., Volkman, D.J. Folks, T.M. & Fauci, A.S. Amplification of HTLV-III /LAV infection by antigeninduced activation of T-cells and direct suppression by virus of lymphocyte blastogenic responses. *J. Immunol.* 1987; 138: 1719-1723.
  24. Modrow, S., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Gallo, R.C., Wong-Staal, F. & Wolf, H. Computer-assisted analysis of the envelope protein sequences of seven HIV isolates: Prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J. Virol.* 1987; 61: 570-578.
  25. Narvanen, A., Korkolainen, M., Kontio, S., Suni, J., Turtianen, S., Partanen, P., Soos, J., Vaheri, A. and Huhtala, M.L. Highly immuno-reactive antigenic site in a hydrophobic domain of HIV-1 gp41 which remains undetectable with conventional immunochemical methods. *AIDS* 1988; 2:119-123.
  26. Oyaizu, N., Chirmule, N., Kalyanaraman, V.S., Hall, W. W., Good, R.A., Pahwa, S. Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope glycoprotein gp120 produces immune defects in CD4+ T lymphocytes by inhibiting Interleukin-2 mRNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 2379-2383.
  27. Pahwa, S., Pahwa, R., Good, R.A., Gallo, R.C. & Saxinger, C. Stimulator and inhibitory influences of Human Immunodeficiency Virus on normal B-lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1986; 83: 9124-9128.
  28. Ruegg, C.L., Monell, C.R. & Strand, M. Inhibition of lymphoproliferation by a synthetic peptide with sequence identity to gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1989, 63: 3257-3260.

29. Sattentau, Q.J., Dalgleish, A.G., Weiss, R.A. & Beverley, P.C. Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection. *Science* 1986; 234: 1120-1123.
30. Shalaby, M.R., Krowka, J.F., Gregory, T.J., Hirabayashi, S.M., McCabe, S.M., Kaufman, D.S., Stites, D.P. & Ammann, A.J. The effects of Human Immunodeficiency Virus recombinant glycoprotein on immune cell functions in vitro. *Cell Immunol.* 1987; 110: 140-148.
31. Siliciano, R.F., Knall, C., Lawton, T., Berman, P., Gregory, T. and Reinherz, E.L. Recognition of HIV glycoprotein gp120 by T cells. *J. Immunol.* 1989; 142: 1506-1511.
32. Viscidi, R.P., Mayur, K, Ledermann, H.M. and Frankel, A.D. Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by Tat protein from HIV-1. *Science* 1989; 246: 1606-1608.
33. Wainberg, M.A., Blain, N. & Spira, B. Inhibition of human lymphocyte mitogenesis by human and other retroviruses. Differential effect of Interleukin-2 restoration of responsiveness. *AIDS* 1987; 1: 83-87.



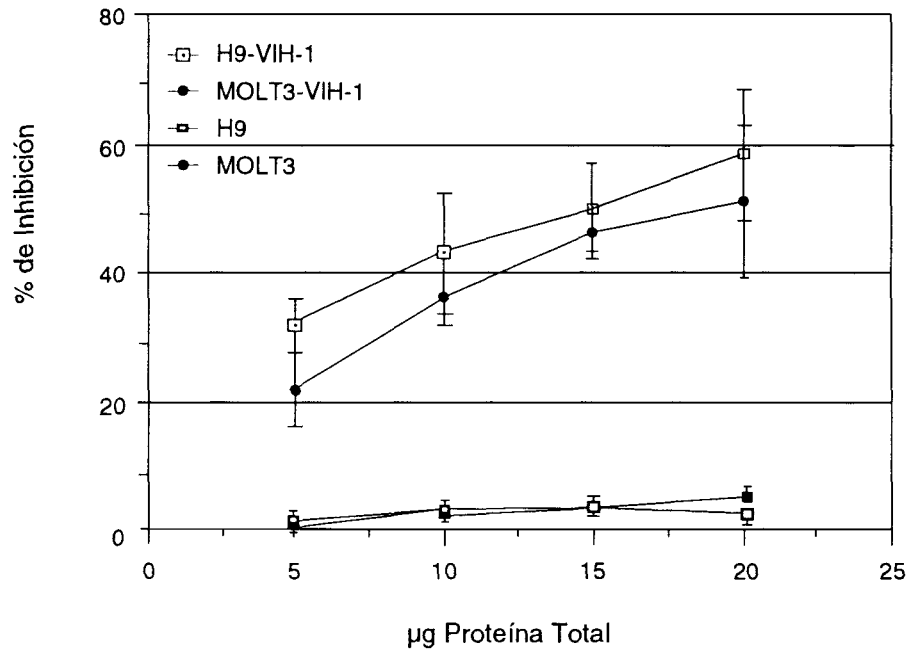


Figura 1: Supresión de la linfoproliferación por VIH-1. VIH-1 obtenido de dos líneas celulares induce supresión en un cultivo de linfocitos estimulados con PHA. Las células sin infectar tratadas en la misma forma, se usaron como controles.

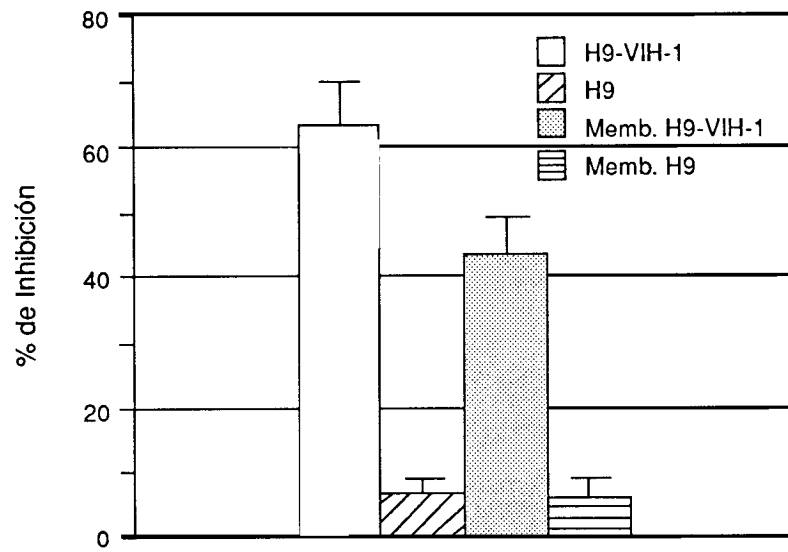


Figura 2: Efecto de membranas celulares aisladas de H9 VIH-1 sobre la linfoproliferación. Las membranas obtenidas a partir de células infectadas inducen supresión de más de 40% en contraste con la poca supresión observada en los controles.

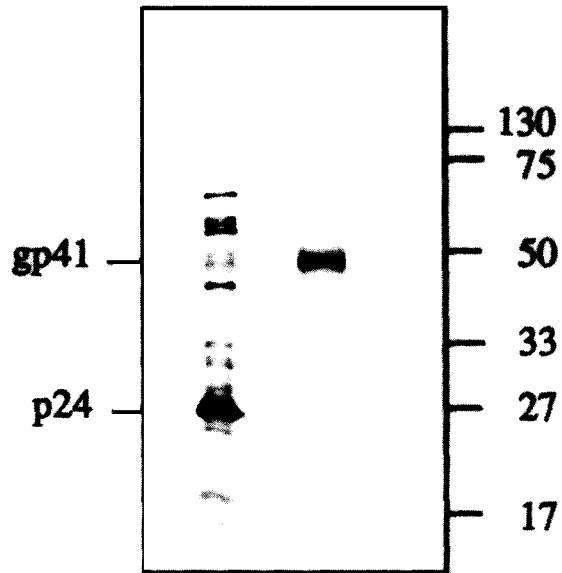


Figura 3: Western blot de gp41 purificada. 5  $\mu$ g de VIH-1 a la izquierda y 20 uds. de gp41 en el centro fueron revelados con una mezcla de sueros de pacientes seropositivos. El blot muestra una banda de gp41 libre de otras proteínas virales. A la derecha estan los marcadores de peso molecular.

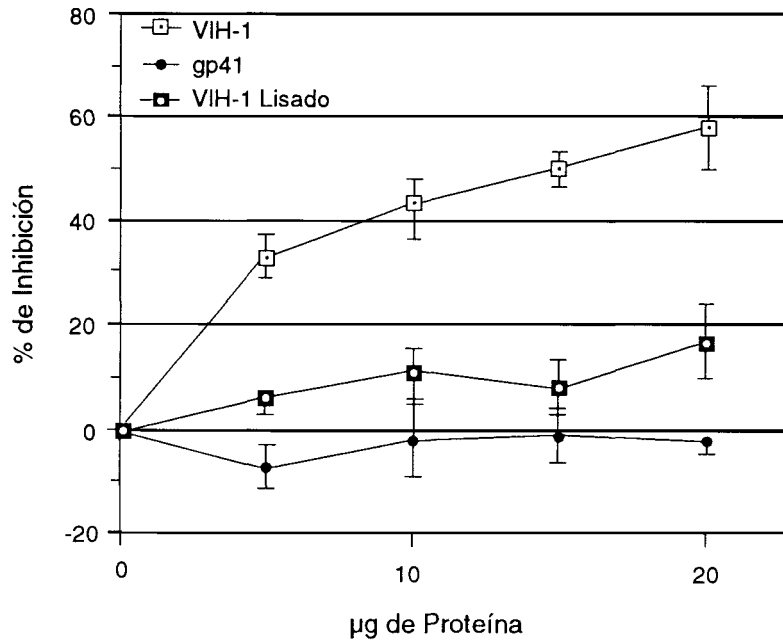


Figura 4: Comparación de la capacidad supresora de VIH-1 y gp41. La gp41 purificada no muestra la capacidad supresora que tiene VIH-1. Virus tratado con tampón de lisis se usó como control.

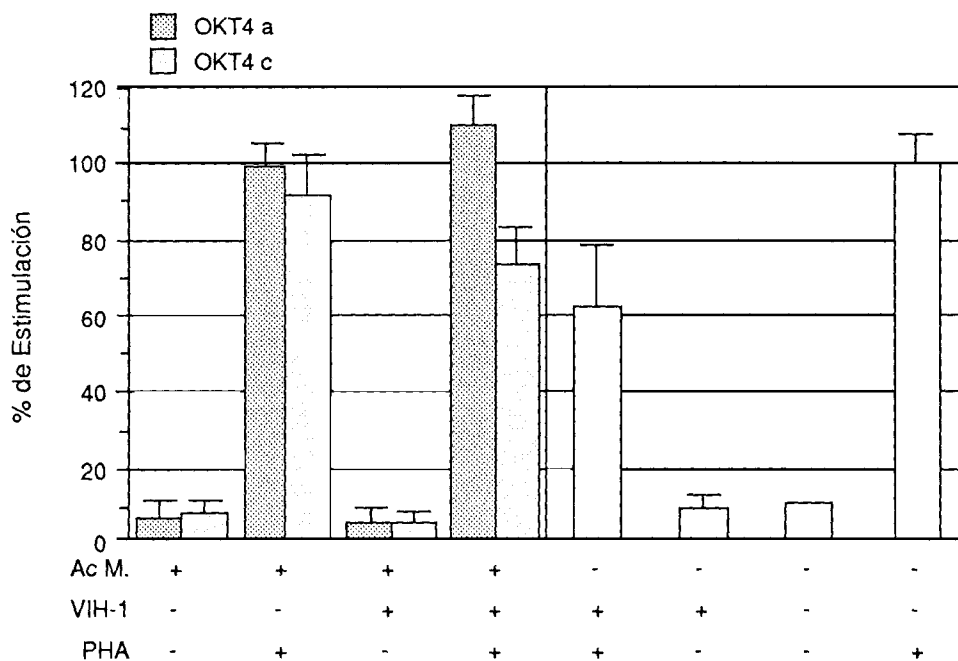


Figura 5: Neutralización de la actividad supresora por AcM. anti-OKT4a. Linfocitos fueron preincubados con anticuerpos monoclonales (AcM.) antes de añadir el virus. Solo anti-OKT4a bloqueó la supresión observada en el control de la primera columna blanca. Los anticuerpos no mostraron efecto sobre las células o sobre el virus. Anti-OKT4c se usó como control negativo.